

5 Zusammenfassung

In der hier vorgelegten Arbeit wurden neue Ansätze zur Identifizierung tumorassoziierter T-Zellepitope verfolgt.

Zum einen wurde das Ergebnis artifiziieller neuronaler Netze überprüft, mit denen Peptide vorhergesagt wurden die nicht den üblichen Bindungsmotiven für HLA-A*0201 entsprechen. Die 7 aus diesen Vorhersagen resultierenden Peptide wurden im Vergleich mit 7 Ankerposition-modifizierten Varianten in T-Zellassays getestet und zeigten sich alle potent im Induzieren von T-Zellantworten nach *in vitro priming* gesunder Spendern. Auch zeigten sich insgesamt gegen alle *ex vivo* T-Zellantworten in fünf untersuchten Melanompatienten. Für drei der Peptide konnte gezeigt werden, daß T-Zellen, die mit der modifizierten Peptidvariante induziert wurden auch in der Lage waren, mit dem natürlichen Peptid beladene HLA-A2 positive Zielzellen zu erkennen. Für diese drei Peptide konnte außerdem die natürliche Prozessierung durch Tumorzellen nachgewiesen werden.

Zum anderen wurden über 2000 Peptide in einem völlig neuen Ansatz getestet. Erstmals wurde eine solche Anzahl von Peptiden in einem Stimulationsansatz untersucht und auch die Testung der Peptide in vollkommen HLA-unabhängigen Ansätzen wurde so noch nicht durchgeführt. Durch die Durchführung der Versuche mit Spendern, die nicht nach ihrem HLA ausgesucht wurden konnten neue Erkenntnisse zu Bindungsmotiven von HLA-Molekülen und zur Verbesserung der Algorithmen gewonnen werden. Faßt man die Ergebnisse aus allen Analysen dieser Arbeit zusammen, konnten insgesamt 122 neue potentielle T-Zellepitope für verschiedene HLA-Allele identifiziert werden.

Außerdem wurde die Expression der für die Vorhersagen verwendeten Proteine mittels RT-PCR untersucht, hierbei konnte gezeigt werden, daß nur wenige der Antigen ausschließlich in Tumorgewebe exprimiert sind und daß auch Proteine wie LAGE, GAGE und NY-ESO, die eigentlich als cancer/testis Antigene beschrieben wurden, eine weitverbreitete Expression aufwiesen. Desweiteren konnte bei näherer Untersuchung der Expression der MAGE-A Familie der cancer/testis Antigene, deren Expression nur im Melanom und in Zelllinien gefunden wurde, demonstriert werden, daß in jedem untersuchten Melanom mindestens ein Mitglied dieser Familie exprimiert wird. Die Gene aus dem invertiert duplizierten Subcluster III werden mit denen einer anderen CTA Familie, den CSAGs koexprimiert.

6 Summary

In the work presented here, new approaches for the identification of tumor-associated T cell epitopes were employed.

Using artificial neural networks 7 HLA-A*0201-restricted potential T cell epitopes, that do not conform to the canonical anchor motif for this HLA molecule, were predicted and tested in comparison with 7 anchor-position modified variants of these peptides. All of these peptides were able to induce T cell responses after *in vitro* priming of T cells from healthy donors. In five melanoma patients *ex vivo* T cell responses to all of these peptides were detected.

For three of the peptides it was shown that T cells induced with the modified version of the peptide responded to the natural counterpart as well when loaded on HLA-A2 positive target cells. For these three epitopes it was also confirmed that they were naturally processed and presented by tumor cells.

In addition more than 2000 peptides were tested using a new approach. For the first time such a high number of peptides were assayed using a stimulation method where the analysis was totally independent from the expressed HLA. By doing so, new insights in the binding motifs of HLA molecules could be obtained and used to improve the algorithms.

Taken together the results of all the analyses performed in this work, a total of 122 new T cell epitopes matching different HLA alleles could be identified.

Furthermore, the expression pattern of the proteins used for epitope prediction were analyzed using RT-PCR. It was demonstrated that only a few of these antigens are expressed exclusively by tumor cells. Also proteins described as cancer/testis antigens LAGE, GAGE and NY-ESO showed a widespread expression in the analysed samples. In addition, detailed examination of the expression of the MAGE-A family of cancer/testis antigens showed that these antigens are expressed solely by melanomas and different cell lines. At least one member of this family was expressed by every melanoma sample analysed.

It could be shown that the genes of the inverted duplicated MAGE subcluster III are coevally expressed with another family of CTA, the CSAGs.